



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**La resistencia a los antibióticos: un problema de salud global.
Bases de la actividad y resistencia a las fluoroquinolonas.**

**Antibiotic resistance: a global health problem.
Bases of activity and resistance to fluoroquinolones.**

Autor: D. Rafael Fernández Díaz

Director/es: D. Jesús Navas Méndez

SANTANDER, JUNIO 2019

Índice

1. Resumen y Abstract.....	Pag.2.
2. Introducción. Resistencia a los antibióticos, problema de salud mundial.....	Pag.3-10.
3. Susceptibilidad y resistencia.....	Pag.10-13.
4. Transferencia genética horizontal.....	Pag.13-17.
5. Plásmidos.....	Pag.17-20.
6. Mecanismo de resistencia.....	Pag.20-22.
7. Las quinolonas.....	Pag.22-23.
8. Mecanismo de acción de quinolonas.....	Pag.24.
9. Mecanismos de resistencia específicos a quinolonas.....	Pag.24-26.
10. Resistencia mediada por plásmidos.....	Pag.26-27.
11. Antibiograma	
• Introducción.....	Pag.28-29.
• Objetivos.....	Pag.29.
• Materiales y métodos.....	Pag.29-30.
• Resultados y Discusión.....	Pag.30-31.
12. Conclusiones.....	Pag.32.
13. Bibliografía.....	Pag.33.

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los principales problemas y riesgo para la salud humana a nivel mundial. La gran capacidad de adquisición y el uso indiscriminado de los antibióticos ha provocado la aparición de resistencias, lo que supone una limitación de su efecto terapéutico y un riesgo para la salud. Desde la Organización Mundial de la Salud se promueven iniciativas para concienciar a los gobiernos y grandes organismos internacionales del efecto sobre la salud y el desarrollo humanos desde un enfoque multisectorial, que incluye a los sectores sanitario, agrícola y ganadero. La farmacorresistencia es un problema que surgió desde los inicios de la utilización de los antibióticos, a los tres años de la introducción de la penicilina en la práctica clínica apareció la primera cepa de *Staphylococcus aureus* resistente. Las quinolonas son una de las clases de antibióticos mas prescritos y utilizados en la actualidad. Se describen los mecanismos de resistencia a estos compuestos, incluyendo las mutaciones en el gen codificante para la topoisomerasa II (*gyrA*), porinas de la familia Omp y resistencia adquirida por plásmidos. La parte práctica del trabajo consiste en una introducción al seguimiento y control de la resistencia en las cepas aisladas en el servicio de Microbiología Clínica del hospital Marqués de Valdecilla. Se ha estudiado la susceptibilidad de 5 cepas de *Corynebacterium aurimucosum* a 8 compuestos antimicrobianos representativos de las principales familias de antibióticos por el método E-test.

ABSTRACT:

Resistance to antibiotics has become one of the main problems and health risks worldwide. The great capacity of acquisition and the indiscriminate use of antibiotics is assuming the emergence of drug resistance which implies a limitation of the therapeutic effect and a risk to human health. The World Health Organization is trying to carry out strategies to raise awareness of the effect on human health and development on major international organizations, but from a multisectoral approach that takes into account the health sector, agriculture and livestock. Drug resistance is a problem that arose from the beginning of the antibiotic use: Three years after the introduction of penicillin in clinical practice, the first *Staphylococcus aureus* penicillin-resistant was isolated. The quinolones are one of the most prescribed and used antibiotic group nowadays. Resistance mechanisms to quinolones will be analyzed as mutations in target regions like topoisomerase II (*gyrA*), porins from the Omp family and plasmid-borne resistance. The practical part of this work consists in determination of the susceptibility of 5 *Corynebacterium aurimucosum* clinical isolates from Valdecilla University hospital to 8 compounds representative of the main antibiotic families by means of antibiograms performed with the E-test system.

Introducción

La resistencia a los antibióticos (AMR) se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, tanto es así, que desde la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha impulsado un sistema de vigilancia para controlar este fenómeno. El sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos desarrollado por la OMS se denomina Global Antimicrobial Resistance Surveillance (GLASS).

Este sistema, en funcionamiento desde 2015, ha recogido información de más de 50 países diferentes, en los que más de 500.000 pacientes han sufrido infecciones causadas por bacterias resistentes. Las bacterias más problemáticas en este sentido son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella* spp. Entre algunos de los datos más destacables se encontraba la resistencia a penicilina, uno de los antibióticos más utilizados a nivel mundial. El sistema registró entre 0% y 51% de resistencias a penicilina en los países sujetos a estudio. Además la resistencia mostrada por *E.coli* asociada a infecciones urinarias estaba entre 8% y 65% con respecto a un fármaco comúnmente utilizado en su tratamiento como es el ciprofloxacino ¹.

El Dr. Marc Sprenger, director de la secretaría para la resistencia a los antibióticos de la OMS, alerta de la grave situación que supone este fenómeno en la salud a nivel mundial, ya que esta farmacorresistencia está presente en algunas de las infecciones más frecuentes entre la población.

Desde la OMS se insta a todos los países a colaborar con este sistema de vigilancia con el objetivo de recoger datos a escala global para conocer mejor y poder combatir la fármaco-resistencia. Este proyecto está en sus inicios y constituye una de las principales medidas para difundir a nivel mundial el grave problema de salud pública que supone la resistencia a los antibióticos.

El sistema GLASS, cuyo fin principal es la recogida de información para controlar y facilitar el conocimiento sobre la AMR, surge utilizando otros sistemas similares como referencia, ya que en otros graves problemas de salud relacionados con las patologías infecciosas (el paludismo, el VIH o la tuberculosis), ya se habían utilizado estas estrategias para determinar la eficacia de diagnósticos y tratamientos, facilitando así la lucha contra las resistencias.

Esta no es la primera ocasión en la que se alerta de esta grave situación, ya que en 2016 los estados miembros de la asamblea general de las naciones unidas (ONU), jefes de estado incluidos, se comprometieron a tomar medidas para abordar el problema de la resistencia a los antimicrobianos. Se estableció una estrategia para abordar el problema desde diferentes frentes, en especial la salud humana, la salud animal y la

agricultura. Es importante mencionar que es la cuarta ocasión en la que la ONU decide tomar medidas contra un problema de salud global, después de casos con mucha repercusión, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades no transmisibles y el virus Ébola ².

Desde la OMS se recalcó la importancia de reconocer el problema de la fármaco-resistencia como un problema global, ya que ningún país puede combatirlo por sí mismo. De hecho, se reconoció la necesidad de establecer mayor control sobre el volumen excesivo de antimicrobianos que utilizamos, así como llegar a consensos para promocionar el uso responsable y reducir las necesidades de su uso.

El planeta está saturado con estos agentes antimicrobianos, lo que ha contribuido de manera significativa en la selección de cepas resistentes. La evolución de generaciones de microbios resistentes a los antibióticos y su distribución en poblaciones a lo largo de todo el globo es el resultado de muchos años de selección continua y presión de las actividades humanas a través del uso excesivo e irresponsable de los antimicrobianos. Este no es un proceso natural, si no impulsado por el hombre, que ha desencadenado un cambio en la naturaleza ³.

En conclusión, es necesario empezar a resolver este problema con el compromiso y la implantación de medidas que lo contrarresten, ya que supone un riesgo para el desarrollo, la salud humana y la seguridad a nivel mundial, pero desde un enfoque multisectorial, que tenga en cuenta el medio ambiente, los animales, los alimentos y al ser humano.

La resistencia a los antibióticos, además de ser un problema de salud global, es uno de los pocos procesos que muestran la evolución visible en tiempo real. Esto es importante desde el punto de vista científico, ya que es un proceso sugerente de estudio y seguimiento. Los genes de resistencia adquiridos, que se describen en profundidad más adelante, se originan en microorganismos del medioambiente, y deben ser entendidos para conocer con más detalle los procesos de irrupción, extensión y evolución. Estos estudios se realizan en ambientes clínicos y no clínicos, con el objetivo de descifrar los procesos que regulan la adquisición de nuevas resistencias ⁴.

Desde la ONU también se advierte que no es solo un problema de los hospitales, si no que debemos tomar medidas contra el excesivo uso de antimicrobianos en explotaciones agrícolas y ganaderas, ya que la agricultura y la ganadería tienen su cuota de responsabilidad en este grave problema. La OMS ha establecido un plan de acción global de GLASS basado en los siguientes objetivos:

- Fomentar la formación de sistemas nacionales de vigilancia e impulsar un conjunto de normas armonizadas.

- Estimar, mediante una serie de indicadores, el alcance y la carga de AMR a nivel mundial.
- Analizar datos globales.
- Detectar resistencias emergentes y su propagación internacional.
- Promover la implementación de programas de prevención y control específicos.
- Evaluar el impacto de las intervenciones⁵.

El sistema GLASS ya cuenta con un manual sobre la fase temprana de implementación, centrada en la resistencia en patógenos bacterianos comunes. Este manual comprende los hallazgos llevados a cabo sobre el periodo 2015-2019. Sobre lo aprendido en este período se desarrollaran nuevos postulados para el proyecto.

Existen estudios que documentan y reflejan la creciente amenaza que supone la utilización indiscriminada de antibióticos en todos los campos, como en el caso del informe sobre el uso de antibióticos realizado por el equipo de Klein en 76 países, realizado en pacientes mayores de 16 años. Este informe supone una actualización de los datos para evaluar las tendencias globales en el consumo de antibióticos. Encontraron que la tasa de consumo de antibióticos en países de ingresos bajos y medios ha alcanzado los niveles de consumo en países con ingresos altos e incluso algunos países superan esos niveles⁶.

Según un informe del gobierno del Reino Unido, si no se toman las medidas adecuadas, en 2050 la resistencia a los antibióticos podría tener repercusiones no solo en la salud sino también en la productividad, llegando a influir en el producto interior bruto (PIB) de ese país. Un problema adicional es que el desarrollo de nuevos antibióticos no se considera rentable y muchas compañías farmacéuticas importantes lo han abandonado. Por lo tanto es necesario analizar la rentabilidad del desarrollo de nuevos antibióticos en función del volumen de ventas previsible y el precio del producto. Impulsando y facilitando la investigación y con nuevos incentivos para las compañías farmacéuticas podríamos revertir la situación actual⁷.

La falta de acceso a los antibióticos todavía causa más muertes en todo el mundo que los propios mecanismos de resistencia de los antibióticos. En los países en desarrollo, el acceso inadecuado a los antibióticos entre los sectores más pobres de la población suele ir acompañado del exceso de consumo de las clases medias. Se estima que la provisión universal de antibióticos podría evitar el 75% de las muertes por neumonía en los niños de familias con escasos recursos. Es necesario establecer un equilibrio entre la regulación del uso excesivo e incontrolado de antibióticos para evitar los mecanismos de resistencia y la expansión del acceso al tratamiento a los más desfavorecidos. Se trata de un desafío muy complicado.

Se establece un paralelismo con los problemas del cambio climático, debido a que la repercusión de la resistencia a antibióticos y el cambio climático son efectos a largo plazo y los responsables políticos y sociales practican una política de toma de decisiones a corto plazo. Por lo tanto debemos concienciar a toda la población para que tome medidas. Y no solo en relación con el uso en humanos, porque según las estimaciones actuales se considera que el 80% de los antibióticos que se consumen en los EE. UU. se emplean como promotores del crecimiento del ganado o como herramientas baratas de prevención de infecciones. El establecimiento de cuotas y gravámenes económicos a estas prácticas podría prevenir el uso innecesario de antibióticos en animales y derivar recursos a la investigación y al desarrollo de nuevos antimicrobianos ⁷.

Sin embargo, mientras persisten las diferencias en el acceso a las drogas, muchos sectores de la población continúan afectados por altas tasas de infecciones, y alta mortalidad y morbilidad relacionadas con las enfermedades infecciosas, con bajas tasas de curación. Las conclusiones de los estudios realizados enfatizan la necesidad global de vigilancia en el consumo de antibióticos, para apoyar las políticas de reducción de su consumo y control de la aparición de resistencias, al tiempo que se garantiza el acceso a estas drogas que salvan vidas. El plan de acción global de resistencia a los antimicrobianos, avalado por los estados miembros de la OMS y la asamblea general de las Naciones Unidas, recomienda que todos los países recojan y reporten datos de consumo de antibióticos (Figura1).

Estos estudios se realizan porque se necesitan datos de vigilancia sobre el uso de antibióticos a nivel nacional para monitorizar las tendencias nacionales y globales a lo largo del tiempo y comparar el uso de antibióticos entre los países, proporcionar una base para la evaluación de esfuerzos futuros, habilitar análisis epidemiológicos de la asociación entre el uso de antibióticos y la aparición de resistencias y apoyar políticas que tengan como objetivo controlar la aparición de las mismas.

Dada la urgencia de la amenaza planteada por el aumento de los niveles de resistencia a antibióticos, y en ausencia de datos de vigilancia global armonizados y financiados sobre el uso de antibióticos, se han desarrollado nuevas estrategias como las bases de datos sobre el consumo de antibióticos, para realizar un seguimiento de los patrones de consumo a través de los países. **Los datos reportados en 71 países reflejan que el consumo de antibióticos aumentó un 36% entre 2000 y 2010 ⁶.**



Figura 1. Esquema del Plan nacional de resistencia a antibióticos (PRAN) del aumento del consumo de antimicrobianos y para la conciencia del uso responsable.

Los antibióticos han sido los mejores fármacos jamás desarrollados debido a su eficacia para combatir las infecciones y la reducción en la mortalidad global que se produjo a raíz de su introducción en la práctica clínica. Sin embargo, prácticamente desde el descubrimiento de estos fármacos se reconocieron mecanismos de resistencia por parte de las bacterias. Para solucionar este problema se optó por el desarrollo de nuevos antibióticos. La penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en 1928, y en 1940, varios años antes de su introducción como medida terapéutica, una penicilinas bacteriana fue identificada por dos miembros del equipo que desarrolló de la penicilina.

En el caso de la estreptomina, introducida en 1944 para el tratamiento de la tuberculosis, también se encontraron cepas mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes durante el tratamiento de los pacientes. El agente de la muerte blanca (*M. tuberculosis*) es un patógeno importante que se encuentra tanto en países en vías de desarrollo como en las naciones industrializadas y se convirtió en el siglo XX en un patógeno de alta mortalidad. Muchos de los patógenos bacterianos asociados con epidemias de enfermedad humana se han convertido en multi-resistentes (MDR) después del uso de los antibióticos ³.

Desafortunadamente, la vital necesidad de estos medicamentos ha tenido un importante inconveniente ambiental. En los 60 años desde su introducción, una cantidad colosal de antibióticos han sido producidos y empleados para una amplia variedad de propósitos. Las mejoras en la producción a lo largo del siglo XX y principios del siglo XXI han proporcionado la capacidad de producir cada vez más compuestos de

forma más económica y a gran escala, que han desencadenado una utilización desmesurada.

El descubrimiento de los antibióticos es considerado uno de los eventos más significativos relacionados con la salud de los últimos tiempos, y no solo por su impacto en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Los estudios con estos compuestos a menudo han mostrado resultados inesperados no solamente en el campo de la antibioterapia, sino también algunos efectos que indican otras actividades biológicas. El resultado ha sido un aumento significativo del uso en otras aplicaciones de los antibióticos, como su utilización en el tratamiento de procesos virales y como antitumorales³. En algunos casos, las aplicaciones alternativas superaron en efectividad e importancia a los de la actividad antibiótica, como en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular o su uso como agentes inmunosupresores. Algunos macrólidos, especialmente eritromicina y claritromicina, deoxisperginalina o el ácido micofenólico son algunos ejemplos de antibióticos utilizados en trasplantes por su capacidad de modular la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas e interleuquinas.

El papel predominante de las actividades humanas en la generación de reservorios ambientales de resistencia a antibióticos es incuestionable. Desde la década de 1940, cantidades cada vez mayores de antibióticos destinados a actividades y aplicaciones humanas han sido fabricados y utilizados clínicamente, y liberados al medio ambiente, proporcionando la posibilidad de generar resistencias en los diferentes grupos bacterianos.

Se puede estimar que muchos millones de toneladas de compuestos antibióticos han sido lanzadas a la biosfera durante el último medio siglo. Cabe señalar que el uso terapéutico en humanos representa menos de la mitad de todas las aplicaciones de antibióticos producidos comercialmente.

El vertido de ciprofloxacino en ríos en cantidades superiores a 50 kg diarios por parte de las compañías farmacéuticas en Hyderabad, en el centro de la India, es posiblemente la más extrema de las historias de terror sobre irresponsabilidad en el uso discriminado de antibióticos. Numerosos tipos de actividades antropogénicas no solamente en el campo de la medicina sino también en agricultura y acuicultura entre otros, son ejemplos de la gran variedad de usos y la importante necesidad que suponen estos medicamentos. Además, no se puede subestimar el daño que produce el uso indiscriminado de los antibióticos, no solo en la aparición de resistencias y genes de virulencia, sino también en el daño fisiológico que producen en la biosfera por su uso irresponsable en las diferentes poblaciones de animales, plantas, insectos y por supuesto humanos³.

Es un proceso evolutivo acelerado de forma artificial en lugar de un curso más lento, aleatorio, que se hubiera producido en el caso de la evolución natural. Los estudios de laboratorio han caracterizado numerosos mecanismos genéticos implicados en la evolución de la resistencia a antibióticos. Los roles de plásmidos, fagos y la captación del ADN por parte de las bacterias (proceso conocido como transformación) están bien establecidos, pero pueden existir otros procesos. Por ejemplo, la fusión célula-célula bacteriana podría favorecer la transmisión de resistencias en comunidades microbianas mixtas, como las que se encuentran en los biofilms.

Como consecuencia de ello ha habido un crecimiento de la prevalencia de patógenos con resistencia a los antibióticos. Este aumento de resistencias puede alterar la posibilidad de tratamiento a nivel global, por una parte porque dificulta el tratamiento y el abordaje de infecciones ya presentes en los pacientes y por otra porque afecta a los pacientes que necesitan tratamientos inmunosupresores como son los sometidos a trasplantes, intervenciones quirúrgicas, quimioterapia, intubación y otros métodos de intervención agresiva de la práctica médica que precisan de terapia antibiótica complementaria para su eficacia.⁴

La falta de conocimientos básicos sobre la AMR es una de las razones principales por las que se ha logrado un escaso avance en el conocimiento sobre la prevención y el control efectivos del desarrollo de la resistencia. Los antibióticos han revolucionado la medicina en muchos aspectos, y han salvado innumerables vidas; su descubrimiento fue un giro en la historia de la humanidad. Lamentablemente, el uso de estos excelentes fármacos ha ido acompañada de la rápida aparición de resistencias. Los expertos médicos ahora están advirtiéndolo de un regreso a la era pre-antibiótica o “dark ages” como denominan algunos a los períodos de la historia en los que se desconocían los antibióticos, en los que las enfermedades infecciosas eran devastadoras. Cifras recientes recogidas en la base de datos “The comprehensive antibiotic resistance database” (<https://card.mcmaster.ca>) da cuenta de la existencia de 175.753 alelos de resistencia³. Afortunadamente, el número de genes de resistencia presente en los microorganismos patógenos es menor³.

Susceptibilidad y resistencia

Para analizar con más detalle el problema de la fármaco-resistencia debemos conocer algunos conceptos clave como son susceptibilidad y resistencia, que se analizarán a continuación. Se define un microorganismo como susceptible a un antibiótico dependiendo del nivel de su actividad antimicrobiana y una alta probabilidad de éxito terapéutico. Otro concepto es el de resistencia, referido a un microorganismo con un nivel antimicrobiano asociado con una alta probabilidad de fracaso terapéutico. Basándonos en estos conceptos y criterios, se utiliza el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la duración mínima para matar (MDK) para la clasificación de los microorganismos en función de su susceptibilidad en las categorías de

resistentes, sensibles, tolerantes o persistentes. La CMI se define como la concentración mínima de un antimicrobiano necesaria para prevenir el crecimiento del cultivo bacteriano estudiado⁴.

El concepto de resistencia se utiliza para describir la capacidad de los microorganismos para crecer en medios con elevada concentración de antibióticos, independientemente de la duración de la exposición a los mismos y, como se ha comentado anteriormente, se cuantifica con la concentración mínima inhibitoria (CMI)⁸.

En la práctica los microorganismos estudiados se exponen a diferentes concentraciones del antibiótico, que van aumentando hasta alcanzar la concentración en la cual el crecimiento no se detecta transcurrido un tiempo comprendido entre las 16 y 20 horas de exposición al antibiótico en un medio de cultivo adecuado. La CMI cuenta con dos grandes limitaciones para su utilización como punto de corte en la clasificación de la resistencia de los antibióticos, el primero que no es un parámetro definitivo para discernir entre una cepa bacteriana resistente y una tolerante. Otra dificultad encontrada en la CMI es que las condiciones del estudio *in vitro* en las que se realizan estos ensayos no son las mismas que las condiciones *in vivo*, lo que dificulta la extrapolación de los resultados. Sin embargo, todavía hoy la CMI es el valor métrico utilizado de rutina para la definición de la susceptibilidad a los antibióticos de las cepas bacterianas⁸.

Otra definición reconocida para definir el fenómeno de resistencia sería “cualquier bacteria resultante de una mutación que presenta menor susceptibilidad a la acción de un tratamiento antimicrobiano con respecto a su especie original”. Este concepto es independiente de la CMI, en contraposición con los anteriores conceptos en los que utilizábamos los valores de CMI para establecer los puntos de corte que permiten la clasificación de las cepas en función de su susceptibilidad. Estas mutaciones que reducen la susceptibilidad a la acción de los fármacos son mecanismos de resistencia adquirida.

En el caso de la tolerancia se utiliza para definir la habilidad que tienen algunas cepas para sobrevivir independientemente de la concentración del antibiótico y el tiempo de exposición en un medio adecuado sin cambios en la CMI. Según Kester y Fortune, la tolerancia de las bacterias permite su supervivencia cuando se exponen a unas concentraciones de antibióticos que de otra forma serían letales. La tolerancia surge como consecuencia de mutaciones o adquirida en el medio ambiente, de forma que, en algunos casos, como cuando crecen en condiciones de escasez de nutrientes, cambia su susceptibilidad haciéndose tolerantes al fármaco, y dificultando su acción. En algunos casos los propios antibióticos reducen el crecimiento bacteriano y son

cómplices del proceso de tolerancia. Esta situación de tolerancia inducida por algunos antibióticos supone una reducción de su actividad y letalidad⁶.

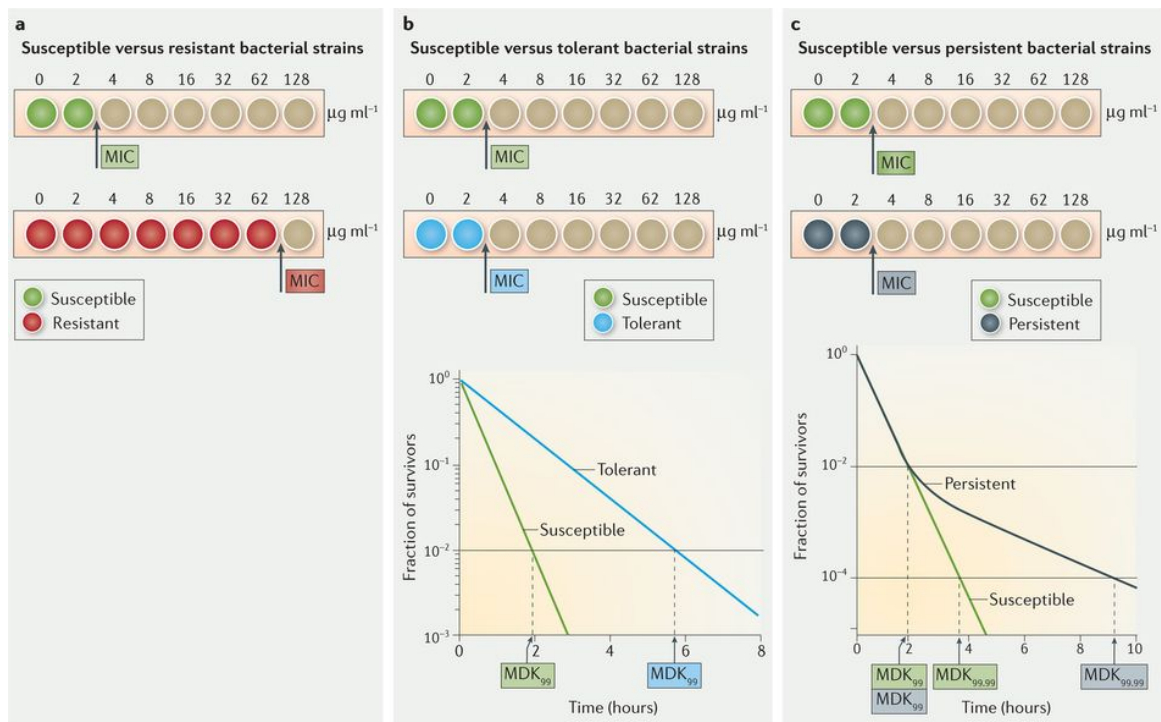
En estos casos la MDK se define como la duración de tratamiento antibiótico necesario para matar a una proporción de la población bacteriana a concentraciones muy superiores a la CMI. La MDK se utiliza para discernir entre aquellas cepas resistentes y aquellas tolerantes. Por ejemplo, la duración mínima del tratamiento necesaria para matar al 99% de la población (MDK₉₉). Utilizando las dos unidades de medida podemos valorar si se trata de una cepa bacteriana resistente (se manifestará un incremento de la CMI) o una cepa tolerante (sufrirá un incremento de la MDK)⁸. (Figura 2)

La tolerancia de las cepas bacterianas puede ocurrir por una ralentización del crecimiento, como comentábamos anteriormente, en el que las condiciones que reducen la velocidad de crecimiento provocan resistencia a la acción de determinados fármacos, debido a que su acción depende del crecimiento bacteriano. Es el caso de los beta- lactámicos, cuya eficacia antimicrobiana es proporcional a la velocidad de crecimiento, lo que refuerza la relación que tienen estos fármacos y el crecimiento bacteriano para su actividad.

La tolerancia también puede producirse como consecuencia del retardo, en la fase estacionaria, en la que las bacterias no crecen, suponiendo un mecanismo que reduce la eficacia farmacológica. Se define como el tiempo de estancamiento de crecimiento bacteriano en condiciones adversas, para reactivar un periodo de crecimiento exponencial en condiciones adecuadas que lo faciliten, como un medio rico en nutrientes⁸.

Otro concepto importante es el de “Persistencia”, entendido como la habilidad de una subpoblación de células clonales bacterianas para sobrevivir en altas concentraciones de antibiótico. De esta forma, en los experimentos se observa como la mayoría de la población bacteriana muere como consecuencia de la actividad bactericida, mientras que la subpoblación persiste durante un mayor periodo de tiempo.

Por otra parte, un mutante que presenta más susceptibilidad a la acción antibiótica que su cepa parental, como consecuencia de una alteración genética, reduce la resistencia natural de las bacterias. Los genes que son responsables de este mecanismo que aumenta la susceptibilidad están siendo estudiados como posible objetivo terapéutico de nuevos fármacos para utilizarse en combinaciones con otros antibióticos⁴.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2. (A). Bacteria susceptible muestra una concentración mínima inhibitoria (CMI) más baja que la cepa resistente. (B). La cepa tolerante muestra una CMI similar a la sensible, sin embargo la MDK₉₉ es bastante superior. (C). La cepa bacteriana persistente muestra similitudes en la CMI y la MDK₉₉, sin embargo la MDK_{99,99} es notablemente superior. Escala de concentración y tiempo (Horas).

Para poder profundizar en la comprensión de este problema global, debemos entender mejor los mecanismos por los cuales se desarrolla la fármaco-resistencia. Es importante destacar que desde hace 70 años se ha ido desarrollando el estudio de los mecanismos de propagación de la resistencia a los antibióticos, entre los que tiene una importancia primordial la transferencia de información genética horizontal (TGH).

Transferencia genética horizontal

Este tipo de transferencia genética está implicada en la aparición de variaciones genéticas que causan resistencia a los antibióticos. En la TGH los genes de resistencia pueden provenir de bacterias del ambiente o comensales, por eso al comienzo de la utilización de terapia antibiótica no se reconocían genes ni mecanismos de resistencia en los patógenos humanos. Los conocimientos que se poseen en estos momentos de los genes de resistencia en patógenos humanos podrían indicar que los microorganismos involucrados en la TGH pudieran ser incluso más numerosos.

Como consecuencia, aparece otro concepto para definir a los microorganismos como “wild type”, que son aquellos que no han adquirido material genético o mutado para

tener estos mecanismos de resistencia. En diferentes investigaciones los microbiólogos han descubierto la posibilidad de que en las bacterias y los virus bacteriófagos se puedan producir cambios fenotípicos espontáneos⁹.

El término "superbacterias" se refiere a los microbios con mayor morbilidad y mortalidad debida a múltiples mutaciones que confieren altos niveles de resistencia a las clases de antibióticos específicamente recomendadas para su tratamiento. Las opciones terapéuticas para estos microbios se reducen, prolongándose los periodos de atención hospitalaria, lo que trae como consecuencia el aumento de los costes de los tratamientos.

La tuberculosis (TB) es el patógeno humano arquetípico, evolucionó con la raza humana y actualmente infecta hasta un tercio de la población mundial. La introducción de cócteles de fármacos antituberculosos se ha convertido en un régimen de tratamiento esencial, con considerable éxito. Sin embargo, por una variedad de razones, la resistencia a múltiples fármacos sigue comprometiendo la terapia de la TB en todo el mundo. Han surgido cepas de *M. tuberculosis* resistentes a cuatro o más escalas de tratamiento, e incluso cepas resistentes a todos los compuestos antituberculosos. Hay que destacar que la resistencia en *M. tuberculosis* se produce exclusivamente por mutaciones espontáneas³.

Los patógenos gramnegativos más prevalentes, como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*, causan una gran variedad de enfermedades en humanos y animales, requiriéndose una gran variedad de antibióticos para el tratamiento de las infecciones provocadas por estos patógenos. Se han observado enfermedades y desarrollo de resistencia a antibióticos durante el último medio siglo. Esto es especialmente evidente con la clase de antibióticos β -lactámicos y su inactivación relacionada con las enzimas β -lactamasas. La TGH ha desempeñado un papel predominante en la evolución y transmisión de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos entre las bacterias entéricas, tanto en infecciones comunitarias como sobre enfermedades adquiridas en el hospital.

El desarrollo de la resistencia está asociado con tratamientos antibióticos prolongados como ocurre en la fibrosis quística (FQ), que es una enfermedad crónica. En este sentido, es importante destacar la evolución de *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno asociado a enfermos afectados por FQ), que ha pasado de ser un microorganismo que se aislaba principalmente en pacientes quemados a constituir una amenaza nosocomial mayor.

Actualmente, la superbacteria más notoria es la grampositiva *S. aureus*, cuya existencia tiene una estrecha asociación con la humanidad, ya que es un microorganismo comensal en el 30% de la población, y su presencia tiene una larga vinculación a infecciones comunes de la piel como los forúnculos. Después del descubrimiento de la

penicilina, parecía que las infecciones por *S. aureus* eran controlables; pero muy pronto aparecieron cepas resistentes. Con el descubrimiento e introducción de la meticilina (el primer diseño de antibióticos anti-resistentes) en 1959 se pensó que se disponía de una defensa segura contra las penicilinasas, pero la aparición del *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) en tan sólo 3 años complicó la capacidad de establecer estrategias terapéuticas. De hecho las siglas SARM en la actualidad son sinónimas de *S. aureus* multirresistente³.

Hay similitudes pero también diferencias claras entre las bacterias grampositivas y gramnegativas, sin embargo, la transmisión mediada por plásmidos es menos común y diferente al mecanismo más común de la TGH. Basándose en el concepto de la reciente evolución del antibiótico, se descubrió en estudios sobre bacterias multirresistentes que los plásmidos de resistencia eran comunes y cepas con genes R (resistentes) eran raras en la era “pre-antibiótica”.

Las superbacterias están omnipresentes en la biosfera; sus consecuencias se agravan enormemente en situaciones conflictivas tales como disturbios civiles, violencia, hambruna y desastres naturales y, por supuesto, con malas prácticas hospitalarias. Las superbacterias no constituyen la única amenaza de origen microbiano, pero son reconocidas como las más amenazadoras con respecto a la morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

La aparición de resistencia farmacológica asociada a eventos de transferencia genética horizontal se debe a tres mecanismos fundamentales:

- Transformación: es el resultado de la utilización de material genético externo para la aparición de una alteración genética en una célula bacteriana.
- Transducción: en este proceso intervienen los bacteriófagos, introduciendo y moviendo material genético entre las bacterias.
- Conjugación bacteriana: se produce durante el contacto célula-célula, en el cual se transfiere la información genética a través de un plásmido de una célula donante a una célula receptora¹⁰.

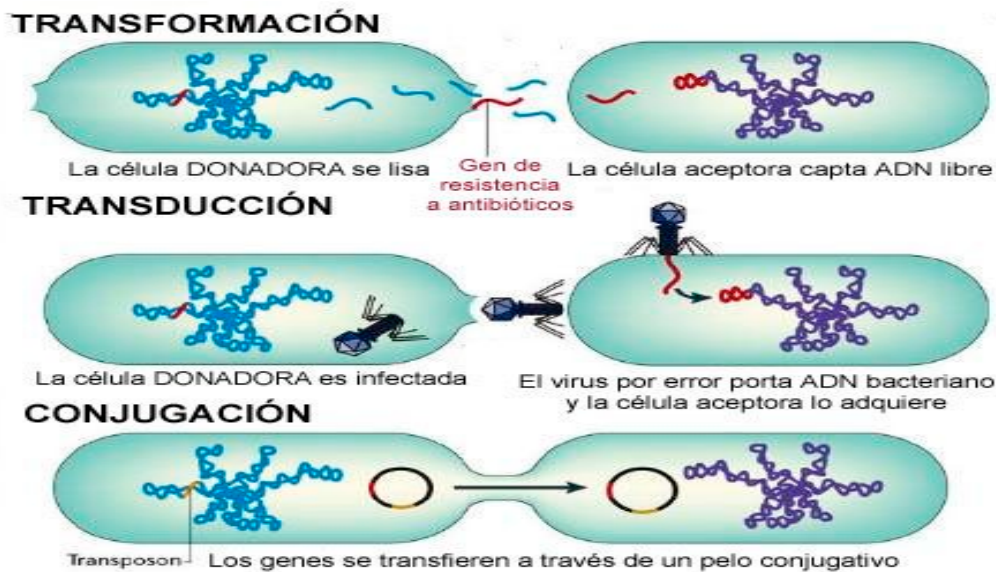


Figura 3. Representación gráfica de los mecanismos fundamentales de Transferencia genética horizontal (TGH). (A). Transformación mediante captación de ADN. (B). Transducción mediante la movilidad de material genético. (C). Conjugación. Mediante la transmisión de plásmidos y contacto célula-célula.

Cabe destacar que las células cuentan con mecanismos de restricción para evitar estos mecanismos de recombinación genética horizontal y de esta forma preservar la estructura e información genética original de cada especie y mantener cierta estabilidad entre las bacterias. También en su mayoría disponen de un mecanismo de defensa inmunitaria, conocido como CRISPR-Cas⁹.

La aparición y diseminación de resistencia a antibióticos en diferentes patógenos han estimulado la realización de innumerables estudios, basados en la investigación de los diferentes fenómenos asociados a la adquisición de resistencia, como es la TGH, la captación de genes, la expresión heteróloga y la mutación.

Los integrones son elementos inusuales de adquisición de genes que fueron identificados y caracterizados por primera vez por Stokes y Hall en 1987⁹. Los integrones no son elementos genéticos móviles por sí mismos pero pueden llegar a serlo en asociación con una variedad de funciones de transferencia e inserción. Son intermediarios críticos en la captación y expresión de los genes R.

Con una mirada más amplia, cada vez existe mayor evidencia de que entidades tales como los integrones (Figura 4) y sus reservorios genéticos desempeñaron papeles importantes en la evolución del genoma y la fluidez dentro del reino bacteriano. Análisis metagenómicos de poblaciones bacterianas de hospitales, instalaciones agrícolas, plantas de tratamiento de aguas residuales y similares son fuentes que han revelado la existencia de muchos integrones completos que contienen genes R³.

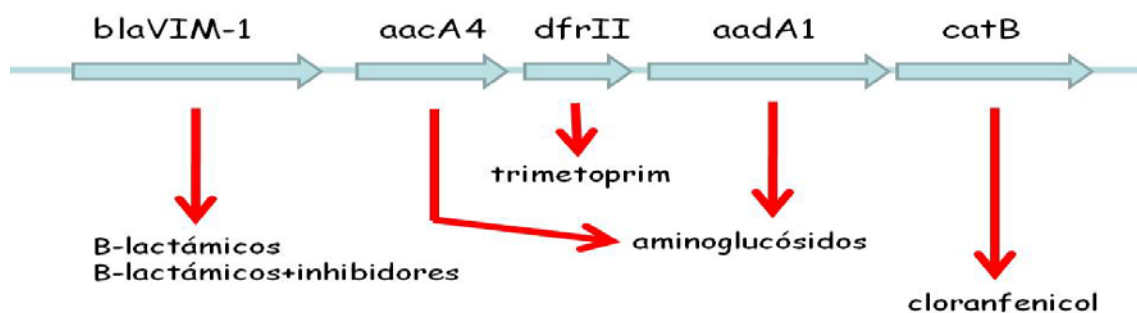


Figura 4. Estructura de Integrón de multirresistencia típico, el Integrón In113. Flechas azules representan genes.

La resistencia intrínseca se refiere a la existencia de genes en los genomas bacterianos que podrían generar un fenotipo de resistencia, es decir, proto- o cuasi-resistencia. A partir de este milenio, la disponibilidad de técnicas de secuenciación rápida del genoma bacteriano ha revelado muchas funciones genéticas intrínsecas en bacterias que pueden conducir a fenotipos de resistencia en el campo clínico³.

Entre los mecanismos que evitan la transferencia genética horizontal se encuentran la falta de compatibilidad en los contactos célula-célula necesarios para una correcta conjugación o para la captación de material de ADN del medio para transformación, especificidad de los virus bacteriófagos, armonía entre el nuevo material genético captado o introducido en el medio con el ADN existente en la célula receptora y la inmunidad proporcionada por la microbiota adquirida en infecciones previas⁹.

No solo se debe hacer hincapié en los mecanismos de TGH sino que existen mecanismos de variación espontánea de material genético que producen mecanismo de resistencia a los antibióticos. Es necesario conocer qué cambios genéticos se producen:

- Alteración de la secuencia de nucleótidos, ya sea de forma individual o de un conjunto adyacente de los mismos. Se suele producir en procesos espontáneos de replicación.
- Otro mecanismo de variación genética son los fenómenos de translocación, replicación, delección o inversión de un fragmento de DNA que contiene el genoma.

Estos mecanismo de variación espontánea junto con los mecanismos de TGH nombrados anteriormente suponen la base de la aparición de cambios genéticos y de variabilidad en los diferentes tipos de células. Estos cambios genéticos pueden provocar en el organismo receptor una situación de notable ventaja, del mismo modo que puede producir algunos cambios que perjudiquen al hospedador, como puede ser la adquisición de información genética de resistencia antibiótica por parte de bacterias patógenas⁹. Las variaciones genéticas son el origen de la resistencia a los antibióticos. De este modo los procesos que explican los mecanismos de resistencia se pueden agrupar en dos grandes grupos, uno son los procesos de mutación y el otro gran grupo la transferencia genética horizontal (TGH), que incluye los fenómenos de transformación, conjugación o los virus bacteriófagos.

La microbiota representa uno de los antiguos reservorios de genes de resistencia a los antibióticos disponibles para su transferencia e intercambio con patógenos clínicos. Algunos estudios han proporcionado evidencias del intercambio reciente de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias de la microbiota y patógenos clínicos. Se han descrito bacterias de la microbiota resistentes a múltiples fármacos. Algunas son portadoras de genes de resistencia contra cinco clases de antibióticos (β -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicoles, sulfonamidas y tetraciclinas) prácticamente idénticos a nivel de secuencia de nucleótido a los genes de diversos patógenos humanos. Esta identidad abarca también regiones no codificantes, así como diversas secuencias y elementos móviles, ofreciendo no solo evidencia de intercambio lateral, sino también de los mecanismos por los que la resistencia a los antibióticos se propaga. La total identidad a nivel de nucleótidos entre genes de resistencia de distintas especies sugiere que se han transferido de forma horizontal recientemente. Esta evidencia había sido documentada previamente entre un organismo no patógeno que vive en la microbiota y un patógeno humano⁶.

Plásmidos

Un importante factor que ha facilitado la expansión global de bacterias resistentes a los antibióticos ha sido la existencia de genes móviles de resistencia, frecuentemente localizados en plásmidos. Se trata de elementos compuestos de ADN de estructura circular con capacidad de replicarse de manera autónoma, en la mayoría de los casos. Los genes de resistencia móviles se han relacionado históricamente con las bacterias gram-negativas y con la codificación de un amplio espectro de betalactamasas y carbapenemasas. Los problemas que suscitan los plásmidos tienen que ver con su plasticidad, que permite cambios genéticos de inserción, delección o duplicaciones¹¹.

Algunos genes de resistencia conocida como CTX-M de betalactamasas están asociados a la presencia de plásmidos. Otros ejemplo es el gen *mcr-1* (Figura 5), que fue encontrado estudiando la transmisión mediante plásmidos de la resistencia a quinolonas.

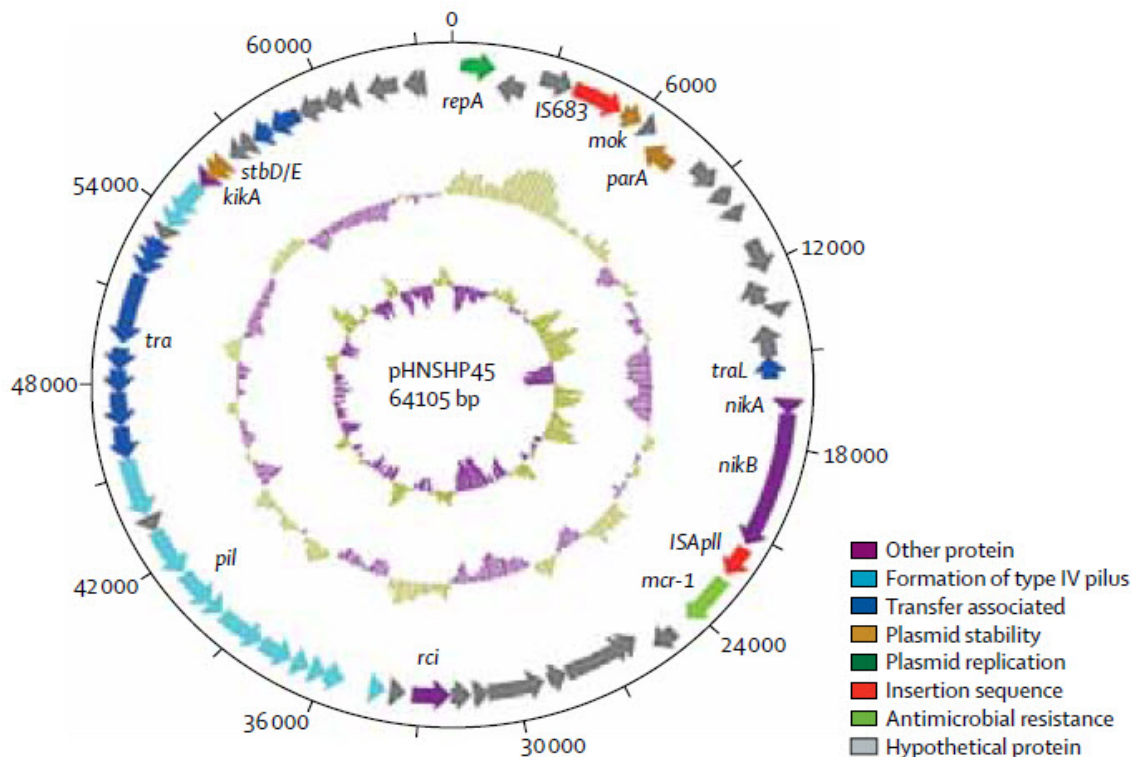


Figura 5. Representación de un Plásmido con la presencia del Gen *mcr-1* (Color verde), que fue encontrado estudiando la transmisión por plásmidos de la resistencia a quinolonas

Existen datos en la Unión Europea sobre los diferentes grados de resistencia que presentan las poblaciones como por ejemplo la resistencia a carbapenémicos en infecciones por *Klebsiella pneumoniae*, que varían desde rangos superiores a 66% en Grecia a valores inferiores al 5% en España o países escandinavos. Otro ejemplo es la aparición de betalactamasas en viajeros que regresaban a los Países Bajos donde aparecieron un 30% de presencia de dicha resistencia en su microbiota cuando los valores de prevalencia previos al viaje eran inferiores a 10%. Esto pone de manifiesto la necesidad de reducir la prevalencia de genes de resistencia antimicrobiana a nivel global¹¹.

La curación de plásmidos es un concepto asociado con la reducción de la presencia de plásmidos en la población bacteriana, con el objetivo de reducir las resistencias asociadas a este método de diseminación, sin perjudicar a las comunidades bacterianas. Se podría desarrollar en los alimentos de forma que solo quedarían bacterias susceptibles a antibióticos o en pacientes que vayan a ser sometidos a intervención quirúrgica para reducir la posibilidad de infecciones nosocomiales adquiridas en el hospital.

Desafortunadamente, estas aproximaciones no se han plasmado aún en tratamientos eficaces contra la transferencia de plásmidos de resistencia. Se deben promover nuevos estudios para conocer la viabilidad de los tratamientos anti-plásmidos y su

aplicación en la práctica clínica para controlar la diseminación de estos elementos genéticos móviles. La curación de los plásmidos se empezó a ensayar en experimentos en los laboratorios de investigación básica en la década de los 70 del siglo pasado, y se prosiguió en la década siguiente. Sin embargo, el interés como posible estrategia terapéutica es reciente. Los métodos para curar plásmidos son muy variados, e incluyen la utilización de agentes químicos, otros plásmidos y, más recientemente, la técnica de CRISPR/Cas. Esta línea de investigación es prometedora y debe ser impulsada a fondo¹¹.

Entre los compuestos que han mostrado actividad frente a plásmidos se encuentran detergentes, antibióticos, y compuestos de origen vegetal que actúan inhibiendo su replicación o su transferencia por conjugación. Algunos derivados de los ácidos biliares inhiben los productos de los genes *pilV* y *pilT* del plásmido *Incl1* de *Salmonella entérica*¹¹ pero no pueden convertirse en un nuevo fármaco debido a las altas dosis que se precisan para producir su efecto y a los efectos secundarios (diarrea). Otros compuestos como la plumbagina, una antraquinona producida por plantas de la familia Plumbaginaceae, tiene efectos inhibidores del ciclo celular en células cancerosas y también actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que la plumbagina reduce la viabilidad de los plásmidos RP4 y otros plásmidos portadores de genes de resistencia en *E. coli*¹¹.

La novobiocina es una aminocumarina que inhibe la ADN girasa a nivel de la subunidad GyrB y actúa eliminando diferentes plásmidos de bacterias diversas como *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis* y algunas enterobacterias. Los antibióticos de la familia de las quinolonas actúan también sobre la ADN girasa bacterianas, y producen también la curación de sus plásmidos. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que esta actividad puede ser interferida al generarse mutantes resistentes a quinolonas por mutaciones puntuales en el gen codificante para la ADN girasa. Estudios en los que se comparó la actividad de curación de plásmidos de cumarinas y quinolonas concluyeron que las cumarinas poseen mayor actividad curativa y una menor frecuencia de aparición de mutantes resistentes¹¹.

Uno de los últimos métodos estudiados son los CRISPR/Cas, son parte del sistema inmune adaptativo de las bacterias y permiten el reconocimiento y la destrucción de secuencias de ADN, de forma que podrían tener la capacidad de curación frente a plásmidos. Este sistema tiene la peculiaridad de poder diseñarse frente genes específicos como podrían ser los codificados por plásmidos, aquí reside su interés como método curativo. Otra de las ventajas es que se podrían utilizar no solo como método directo de curación sino como “vacunación” para prevenir la transmisión de genes de resistencia mediada por plásmidos. Los beneficios de este método parecen prometedores, pero requieren que las herramientas utilizadas sean efectivas cuando se conviertan en fármacos eficaces *in vivo*.

En definitiva, esta línea de actuación frente a los plásmidos, inhibiendo su replicación y/o su transferencia por conjugación es prometedora y requiere que se intensifiquen los estudios, en particular su plasmación en agentes terapéuticos con buenas propiedades farmacológicas que posibiliten su administración a los pacientes para prevenir o combatir las infecciones por bacterias multirresistentes.¹¹.

Mecanismos de resistencia

Desde un punto de vista biomecánico, existen tres tipos principales: ⁴

- Alteración de la diana de los antibióticos.
- Alteración de los transportadores y de genes que regulan la expresión de transportadores del antibiótico.
- Modificación (enzimática) del antibiótico.

Las modificaciones de la diana terapéutica se pueden clasificar en mutación de la diana (ej; Resistencia a quinolonas causada por mutaciones en topoisomerasas bacterianas), reemplazo de la diana (ej; La resistencia a betalactámicos es en ocasiones producida por la adquisición de PBPs quiméricas), cambio enzimático de la diana (ej; La resistencia a la vancomicina ocurre por la reorganización de la pared celular) y protección de la diana (ej; La proteína QnrA, protege a las topoisomerasas bacterianas de la actividad inhibitoria de la quinolonas)⁴.

Reducir la concentración de los antibióticos es otra estrategia de resistencia adquirida por algunos microorganismos, mediante el impedimento de la entrada de los fármacos para realizar su función terapéutica (ej; la falta del transportador de imipenem OprD2 impide la entrada del antibiótico y genera resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*) o mediante la expulsión de antibiótico a través de bombas de eflujo.

Entre los diferentes fenotipos de resistencia adquirida ya conocidos, uno de los mejor estudiados y entendidos es la formación de biofilms y la supervivencia de bacterias. En los biofilms los microorganismos muestran bajos niveles de susceptibilidad a los antibióticos. La resistencia fenotípica es conocida como los cambios genéticos que resultan en los microorganismos y suponen una alteración en la susceptibilidad a los antibióticos. La cantidad de genes implicados en la resistencia fenotípica adquirida por los patógenos humanos es muy baja con respecto a la variabilidad de genes presentes en los microorganismos ambientales y los ecosistemas naturales.

Otros mecanismos de adquisición y transferencia se han identificado, y la naturaleza combinatoria del proceso de desarrollo de la resistencia no debe ser subestimada. La eritromicina fue un claro ejemplo, introducido como alternativa a la penicilina para el tratamiento de *S. aureus* en el hospital de la ciudad de Boston a principios de la década de 1950, fue completamente retirado después de menos de un año porque el 70% de todos los pacientes fueron estudiados por resistencia y en los aislamientos de *S. aureus*

se había descubierto resistencia a eritromicina. Lo mismo se observó con la clorotetraciclina y el cloranfenicol y, posteriormente, con otros antibióticos³.

Se han propuesto muchas soluciones diferentes por expertos y los principales grupos internacionales de salud (por ejemplo, la OMS y los CDC). Entre las propuestas para la acción se encuentran los controles estrictos sobre el uso de antibióticos por los seres humanos:

- Requerir prescripciones precisas (no usar antibióticos para tratar resfriados y otras infecciones virales)
- No poder entregar antibióticos sin receta médica (reduciendo el uso innecesario de antibióticos)
- Uso terapéutico controlado en ganadería y en la agricultura.

Curiosamente, las recomendaciones de Swann de 1969 fueron las primeras en pedir una prohibición del uso no terapéutico en animales y agricultura, una propuesta razonable pero altamente contenciosa. Sugerencias que han sido imposibles de cumplir en muchos países hasta nuestros días³.

Aunque los Países Bajos y Escandinavia han tenido éxito con niveles de resistencia reducidos, está claro que la restricción del uso de antibióticos es difícil de controlar a escala global. La situación de hoy es claramente más compleja. En muchos países en desarrollo, el uso de antibióticos es relativamente incontrolado. Además, ha sido habitual que las compañías farmacéuticas occidentales distribuyan antibióticos que ya no son efectivos o no están aprobados en Europa o América del Norte, a los países en desarrollo.

Muchas estrategias para evitar, inhibir o sortear los mecanismos de resistencia de los diferentes patógenos se han intentado. Los éxitos más notables se concretan en el desarrollo del ácido clavulánico y otros inhibidores de las enzimas β -lactamasas, que se usan frecuentemente en combinación con los antibióticos β -lactámicos. Estas combinaciones han sido muy efectivas, pero las bacterias han encontrado una manera de traspasar nuestras defensas, una serie de β -lactamasas refractarias a la inhibición por clavulanato aparecieron. También se ha propuesto que inhibidores de la virulencia bacteriana pudieran ser utilizados para detener el proceso de la enfermedad y por lo tanto realizar otras estrategias terapéuticas diferentes al uso de antibióticos³. Otros enfoques no antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas implican estimulación o reclutamiento del sistema inmune innato del huésped para combatir las infecciones.

En cuanto a la prevención, un mundo ideal sería aquel en el que se dispusiera de vacunas efectivas contra todas las enfermedades infecciosas. En esas circunstancias el uso de antibióticos se reduciría drásticamente, limitándose a procedimientos

quirúrgicos en hospitales bajo estrictos controles. Sin embargo, a pesar de los años de esfuerzo, hoy son pocas las vacunas antibacterianas ampliamente utilizadas. El caso de la vacuna neumocócica es un modelo de éxito y un ejemplo de lo que se podría llegar a lograr con esta estrategia.

Las quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos muy relevantes desde el punto de vista clínico ya que se trata de una de las clases de antibióticos más utilizados y prescritos actualmente. En principio aparecieron como un tratamiento efectivo frente a infecciones de bacterias Gram-negativas, y posteriormente se desarrollaron nuevos compuestos eficaces frente a patógenos Gram-negativos y Gram-positivos. La primera quinolona introducida como anti-infeccioso fue el ácido nalidíxico, utilizada en 1962 para combatir infecciones de tracto urinario (ITU). Sin embargo, la importancia de este grupo radica en las modificaciones estructurales que, a partir de finales de los años setenta, se introdujeron en el núcleo de la molécula de la 4-quinolona y que han dado lugar a un gran número de agentes antibacterianos.

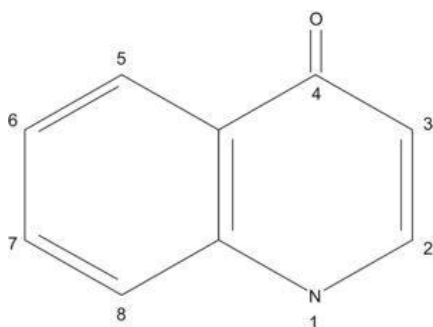
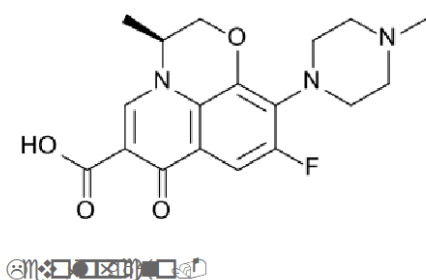
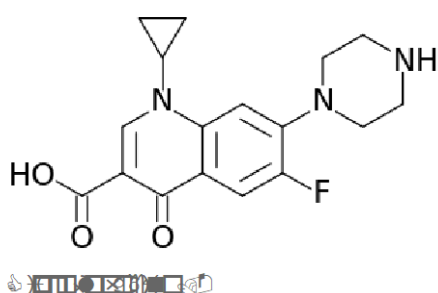
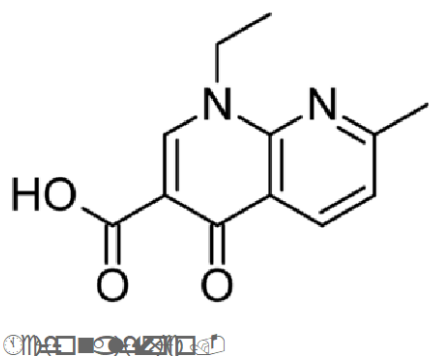


Figura. Estructura de la 4-quinolona, molécula de la que derivan muchas quinolonas usadas en clínica.

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3 (Figura). La potencia y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en posición 6, posiblemente porque mejora la penetración en los tejidos y la unión a las topoisomerasas bacterianas. Frente a bacterias Gram-negativas también aumenta la potencia si en la posición 7 existe un grupo piperacínico (norfloxacin, ciprofloxacino) o un grupo metil-piperacínico (ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino). Además, sustituyentes metilo en el grupo piperacínico mejoran la biodisponibilidad oral. Los compuestos que llevan en la posición 7 un doble anillo derivado del anillo pirrolidónico aumentan su actividad sobre bacterias grampositivas (moxifloxacino). Un grupo metoxi en la posición 8 mejora la actividad frente a anaerobios (moxifloxacino, gatifloxacino)¹².



Las quinolonas pueden clasificarse en generaciones. Las de primera generación (ácido nalidíxico, ácido pipemídico), poco usadas actualmente, son activas frente a enterobacterias y algún otro gramnegativo y son prácticamente inactivas frente a grampositivos, patógenos atípicos y anaerobios. Alcanzan valores bajos en suero, su distribución sistémica es baja y sólo se pueden usar para tratamiento de algunas infecciones urinarias. A partir de aquí ya incorporan un átomo de flúor en la posición 6 y se llaman fluoroquinolonas. Las de segunda generación (norfloxacino) presentan una mucho mayor actividad frente a gramnegativos, incluida *Pseudomonas aeruginosa*, son activas frente a algunos patógenos atípicos, pero tienen moderada actividad frente a grampositivos y prácticamente nula frente a anaerobios. Las concentraciones en suero y muchos tejidos son bajas, por lo que no se suelen usar en infecciones sistémicas. Las de tercera generación (ciprofloxacino, ofloxacino,

levofloxacino) mantienen las características de las de segunda pero además tienen una mejor absorción por vía oral y mejor actividad frente a *P. aeruginosa*, grampositivos y patógenos atípicos. Por sus propiedades farmacocinéticas éstas y las de la siguiente generación pueden usarse para el tratamiento de infecciones sistémicas. Las de cuarta generación (moxifloxacino) aportan una mejora en la actividad frente a grampositivos y además una actividad buena frente a anaerobios, aunque disminuye su actividad frente a *P. aeruginosa*.

Mecanismo de acción de las quinolonas

Las quinolonas actúan inhibiendo el dominio ligasa de dos topoisomerasas, la ADN girasa (topoisomerasa II) y topoisomerasa IV, que están involucradas en la síntesis, transcripción del ADN y la división celular. De forma que las dianas terapéuticas de las quinolonas en los diferentes tipos de bacterias son estas dos enzimas, con diferencias en la efectividad entre las distintas quinolonas. Además, las quinolonas de tercera y cuarta generación son más selectivas frente a la topoisomerasa IV y más efectivas en

infecciones de bacterias gram-positivos y las quinolonas de primera y segunda generación en cambio, más selectivas contra la ADN girasa y adecuadas para cubrir patógenos gram-negativos.

En resumen, la formación de un complejo quinolona-topoisomerasa-ADN provoca un bloqueo en la maquinaria de la replicación resultando en una inhibición de la síntesis de ADN e interrumpiendo la reproducción bacteriana. El efecto dependerá de la concentración del antibiótico, ya que en bajas concentraciones va a provocar un efecto de bacteriostasis por inhibición del crecimiento bacteriano y en altas concentraciones actuará como bactericida, produciendo la muerte celular. El efecto bactericida no depende solo de la concentración de quinolonas, sino también de otros factores que contribuyen, como la reparación incompleta del ADN y la presencia de especies reactivas derivadas de oxígeno.¹²

Mecanismos de resistencia a quinolonas

Las fluoroquinolonas se han utilizado para tratar diferentes tipos de infecciones como infecciones respiratorias (neumonía nosocomial, bronquitis crónica), infecciones de piel, hueso, articulaciones, intra-abdominales e infecciones de transmisión sexual, además de las ITU mencionadas anteriormente. Sin embargo, debido a su alta eficacia antimicrobiana, se han utilizado sin control en humanos y en animales, a pesar de las recomendaciones de las autoridades sanitarias que perseguían regular racionalmente su uso, incluyendo su salvaguarda como antibióticos de reserva. Las recomendaciones se tradujeron en escasas medidas adoptadas en la práctica, lo que ha originado la aparición de numerosas cepas resistentes.

Existen tres mecanismos diferentes por los cuales las bacterias adquieren resistencia a las quinolonas:

- Mutaciones cromosómicas que alteran las enzimas y proteínas diana.
- Mutaciones cromosómicas que impiden que el antibiótico alcance concentraciones terapéuticas o favorecen su expulsión.
- Resistencia transmitida por plásmidos.

Un importante factor a destacar es que los diferentes mecanismos de resistencia no son excluyentes de forma que pueden acumularse provocando altos niveles de resistencia antibiótica.

El mecanismo de resistencia más común son las mutaciones en regiones diana como son los genes codificantes para las topoisomerasas tipo II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* o *parE*). Esto significa que las mutaciones en dichos genes suponen cambios en la afinidad y de las quinolonas por las correspondientes proteínas diana. Las mutaciones más frecuentes se encuentran en los genes *gyrA* y *parC*, y, dentro de estos genes, en una región concreta que se denomina QRDR (región determinante de la resistencia a

quinolonas, del inglés *quinolone resistance-determining region*) y que en GyrA está entre los aminoácidos 67 y 106. Cambios en los aminoácidos en la QRDR alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas en el complejo girasa-ADN y la resistencia se debe a disminución de la afinidad de la quinolona por dicho complejo. Una o dos mutaciones que produzcan cambios no conservativos son suficientes para generar resistencia. El nivel de resistencia dependerá de la especie bacteriana y del tipo de quinolona. Por ejemplo, en *E.coli*, la mutación más frecuente produce una sustitución de la Ser-83 y también son frecuentes cambios en el Asp-87. Estas sustituciones se encuentran también en cepas de otras especies resistentes, en los mismos residuos o en posiciones equivalentes, siempre dentro de la región QRDR¹¹.

Para ser efectivas las quinolonas necesitan atravesar la pared celular y alcanzar concentraciones terapéuticas. Ciertas mutaciones tienen como consecuencia el descenso de la concentración intracelular del fármaco, bien porque limitan su entrada o porque lo expulsan, o las dos cosas, generando resistencia. Los compuestos hidrofílicos como las quinolonas penetran con más dificultad en las bacterias Gram-negativas porque deben atravesar la barrera de lipopolisacáridos, normalmente a través de porinas. Alteraciones en estas proteínas, ya sea por que se pierden, se modifica su composición y/o su regulación pueden producir el efecto de limitar la entrada de las quinolonas. Se ha reportado que las alteraciones de la expresión de algunas porinas como OmpF, OmpC, OmpD o OmpA incrementan la resistencia a quinolonas (y también a otras sustancias)¹¹. También se han descrito cambios estructurales en el LPS de la pared que reducen la permeabilidad, y dado que las quinolonas utilizan tanto las porinas como vías mediadas por lípidos para su entrada en las bacterias, estos cambios pueden suponer un incremento en los niveles de resistencia.

En general, la resistencia adquirida por las bacterias con una mayor concentración o alteración de porinas supone un aumento leve de los niveles de resistencia y no representa un problema terapéutico mayor, aunque existen excepciones en la que las bombas de expulsión aumentan severamente los niveles de resistencia a quinolonas. Estas bombas existen tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos. Las bacterias Gram-positivas cuentan con mayor número de sistemas de eflujo, como NorA o SdrM, relacionadas con *Staphylococcus aureus*, o PmrA de *Streptococcus pneumoniae*. En cuanto a las Gram-negativas, la mayoría de sistemas de eflujo asociados a resistencia son de la familia división de resistencia nodular (RND) como AcrAB-TolC en *E.coli* o MexAB-OprM en *Pseudomonas aeruginosa*¹¹.

También existen sistemas como el PhoP/Q que regulan la biosíntesis de la pared de lipopolisacáridos, de forma que cualquier cambio en la estructura o composición de LPS puede alterar la integridad de la membrana, la supervivencia, adaptación a

diferentes ambientes pero también influir sobre la adquisición de resistencias a quinolonas u otros antibióticos.

Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

El primer gen plasmídico asociado a resistencias a quinolonas, *qnrA*, fue descrito en 1998 en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a ciprofloxacino¹². Desde su aparición han sido identificadas más de 100 variantes Qnr, que se han clasificado en 6 familias diferentes. Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de los pentapéptidos repetidos, que se caracterizan por la presencia de repeticiones en tándem de una serie semiconservada de 5 aminoácidos. Hasta la fecha se han descrito varios tipos de Qnr codificados por genes de origen plasmídico: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* y *qnrS*. Su mecanismo de acción, basado en la protección de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV, se ha estudiado con mucho detalle en cepas que poseen el gen *qnrA1*. Otro mecanismo plasmídico es la enzima AAC(6')-Ib-cr, variante de una acetil-transferasa, capaz de modificar al ciprofloxacino y otras quinolonas con un sustituyente piperacínilo, reduciendo su actividad. Ambos mecanismos mediados por plásmidos proporcionan un bajo nivel de resistencia que facilita el surgimiento y selección de niveles mayores de resistencia en presencia de quinolonas¹³.

En grampositivos la resistencia se produce por pasos. En general, una primera mutación ocurre en el gen de la topoisomerasa IV produciéndose como consecuencia ligeros aumentos de las CMI. Una segunda mutación, preferentemente en *gyrA*, resultará en un mayor aumento de las CMI, que haría que la bacteria fuese resistente a todas las quinolonas. El uso de fluoroquinolonas que actúan en ambas topoisomerasas, la II y la IV, tales como el moxifloxacino, puede tener ventajas sobre otras en la prevención de la resistencia por disminuir la posibilidad de selección de mutantes con algún grado de resistencia¹⁴.

Los genes de resistencia *qnr* (PMQR) han sido detectados en integrones y trasposones asociados a otros determinantes de resistencia como genes de betalactamasas o carbapenemasas. Los PMQR se diseminan de forma muy heterogénea lo que permite que se encuentren en multitud de especies bacterianas y afecten tanto a Gram-positivas como Gram-negativas. Algunos genes como OqxAB están presentes en multitud de cromosomas de la especie *K. pneumoniae*¹² lo que confiere la cualidad de reservorio de estos genes de resistencia y facilita su diseminación. Los PMQR frecuentemente se localizan principalmente en enterobacterias y en algunas ocasiones en bacterias no fermentadoras, siendo *qnr* y *aac* los identificados con más frecuencia.

La resistencia adquirida a quinolonas es un proceso multifactorial y complejo, nuestro conocimiento sobre los mecanismos y el impacto ambiental de su aparición ha avanzado mucho en los últimos años. La investigación debe continuar para

comprender la aparición de resistencias mediadas por la formación de biofilms o la conjugación de genes de resistencia mediada por plásmidos entre otros mecanismos.

PARTE PRACTICA

Determinación de la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos: el antibiograma

El antibiograma es una prueba microbiológica que tiene doble interés: en relación con la terapéutica, debido a que se utiliza para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana cuando se sospecha que es la causante de una infección. La actividad de los antibióticos *in vitro* orienta sobre su posible eficacia *in vivo* y se utiliza como apoyo para la toma de decisiones terapéuticas y la elección del tratamiento antibiótico. El segundo aspecto de interés se relaciona con el estudio y el seguimiento epidemiológico de las cepas resistentes a los antibióticos. Estos estudios se realizan en cada hospital y proporcionan datos que permiten conocer y evaluar la situación a nivel regional, nacional e internacional. En base a los espectros clínicos de los antibióticos y la prevalencia de las resistencias se pueden tomar decisiones tanto preventivas como terapéuticas en los hospitales para evitar en lo posible las resistencias.

El estudio de la susceptibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos se concreta en la determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CMI). La CMI se define como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento del cultivo estudiado. La CMI constituye el valor de referencia que permite establecer una escala de actividad de los diferentes antibióticos sobre la cepa bacteriana que se está analizando.

Para cada cepa objeto de estudio se determina su CMI para un conjunto de antibióticos lo más amplio posible pero que en todo caso debe incluir compuestos representativos de las principales familias de antimicrobianos y en particular los considerados más activos contra la especie bacteriana estudiada. Es evidente que la determinación de la CMI requiere que cada cepa bacteriana objeto de estudio haya sido previamente identificada, a nivel de especie, de manera fiable y precisa.

Existen varios métodos para determinar la CMI: microdilución en caldo, microdilución en placa y el E-test.

Estudio de la actividad de 8 antimicrobianos frente a *Corynebacterium aurimucosum* aislados en el hospital Marqués de Valdecilla

Introducción

Las bacterias que pertenecen al género *Corynebacterium* spp. tienen una morfología típica en forma de maza, porra o bastón. Hay que precisar que a veces se utilizan

indistintamente los términos “difteromorfo”, “corineforme” y “corinebacteria”. Son bacterias grampositivas, no esporuladas, con alto contenido en guanina y citosina (G+C). Algunas especies del género *Corynebacterium* tienen su hábitat en el ambiente, pero la mayoría forman parte de la flora normal de piel y mucosas en humanos y otros mamíferos.

El género *Corynebacterium* fue descrito por Lehmann y Neumann en 1896. La diferenciación entre el género *Corynebacterium* de otras bacterias corineformes está en la positividad de la catalasa, la negatividad de la motilidad, citrato, hidrólisis de gelatina, esculina, oxidasa y algunas características morfológicas. Su filogenia es:

Dominio: “Bacteria”

División: “Actinobacteria”

Clase: “Actinobacteria”

Subclase: “Actinobacteridae”

Orden: “Actinomycetales”

Suborden: “Corynebacterineae”

Familia: “Corynebacteriaceae”

Género: “*Corynebacterium*”

Corynebacterium aurimucosum es un anaerobio facultativo y es fermentativo. Forma parte de la mucosa nasal en el organismo humano. Recientemente se ha reportado que los *C. aurimucosum* de la mucosa nasal inhiben la expresión de los principales factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*, por un mecanismo de quorum sensing. Este hallazgo abre una línea de investigación para el control de la virulencia de patógenos importantes como *S. aureus* por vías alternativas al tratamiento tradicional con agentes antimicrobianos¹⁵.

La mayoría de los aislamientos clínicos de *Corynebacterium* spp. son resistentes a algún antimicrobiano, y buena parte son multi-resistentes (la multi-resistencia se define como la resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos no relacionados y utilizados habitualmente en el tratamiento de las infecciones que las ocasionan), principalmente a betalactámicos, macrólidos aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Se puede citar como ejemplo el estudio realizado con 63 cepas de *C. striatum* aisladas en el hospital Farhat Hached de Sousse (Túnez). En este estudio se encontró una alta frecuencia de cepas multirresistentes, principalmente a ampicilina, eritromicina y quinolonas. La resistencia a ampicilina se relacionó con la presencia del gen *blaA*, codificante para una beta-lactamasa de la clase A. En las cepas resistentes a quinolonas se encontraron mutaciones responsables de la sustitución de uno o dos residuos del gen *gyrA*¹⁶.

En los estudios realizados hasta la fecha todos los aislados clínicos de *Corynebacterium* spp. resultaron susceptibles a los glicopéptidos y a linezolid. En la práctica clínica, se usan también otros tipos de antibióticos para tratar infecciones causadas por *Corynebacterium* spp., como β -lactámicos y aminoglucósidos. En todo caso, el tratamiento debe establecerse considerando los resultados del antibiograma y la respuesta del paciente.

Objetivos

El propósito de este estudio es introducir al alumno en la metodología de los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos de cepas bacterianas. El estudio se ha focalizado en el análisis de la sensibilidad a 8 antibióticos de las 5 cepas de *C. aurimucosum* aisladas en el servicio de Microbiología Clínica del hospital Valdecilla desde 2015 hasta la fecha.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas. Cultivo y conservación.

Las 5 cepas de *C. aurimucosum* fueron aisladas en el período 2015-2019 para un estudio de *Corynebacterium* spp. relacionados con infección en humanos. Se han secuenciado varias decenas de cepas de *Corynebacterium* procedentes de varios países. En este estudio, el grupo español de investigación del profesor J. Navas ha aportado 20 cepas de diversas especies de *Corynebacterium*, aisladas en el hospital Marqués de Valdecilla. Entre ellas, 4 cepas de *C. aurimucosum* aisladas en el servicio de microbiología del Hospital Valdecilla. Las cepas se crecieron en placas de agar sangre a 37°C. La identificación como *C. aurimucosum* se realizó usando el sistema API Coryne V2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y fue confirmada por la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, utilizando la plataforma Vitek-MS (bioMérieux), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cepas bacterianas se conservan en caldo BHI-glicerol (20%) a -80°C¹⁷.

Ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos

Se determinó la susceptibilidad a 8 antimicrobianos (tetraciclina, vancomicina, penicilina, ciprofloxacino, clindamicina, ceftarolina, linezolid y gentamicina) mediante el método E-test en placas de medio Mueller-Hinton. Las cepas se clasificaron como sensibles, intermedias o resistentes de acuerdo a los criterios definidos por el CLSI¹⁶.

Antibiótico	Sensibilidad	Resistencia
Gentamicina	<4	>16
Linezolid	<4	>8
Ceftarolina	<1	>4
Clindamicina	<0.5	>4
Ciprofloxacino	<1	>4
Penicilina	<0.125	>2
Vancomicina	<2	
Tetraciclina	<4	>16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Susceptibilidad de *C. aurimucosum* a 8 compuestos antimicrobianos.

Los valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) de los 5 *C. aurimucosum* frente a los 8 compuestos antimicrobianos ensayados se recogen en la Tabla.

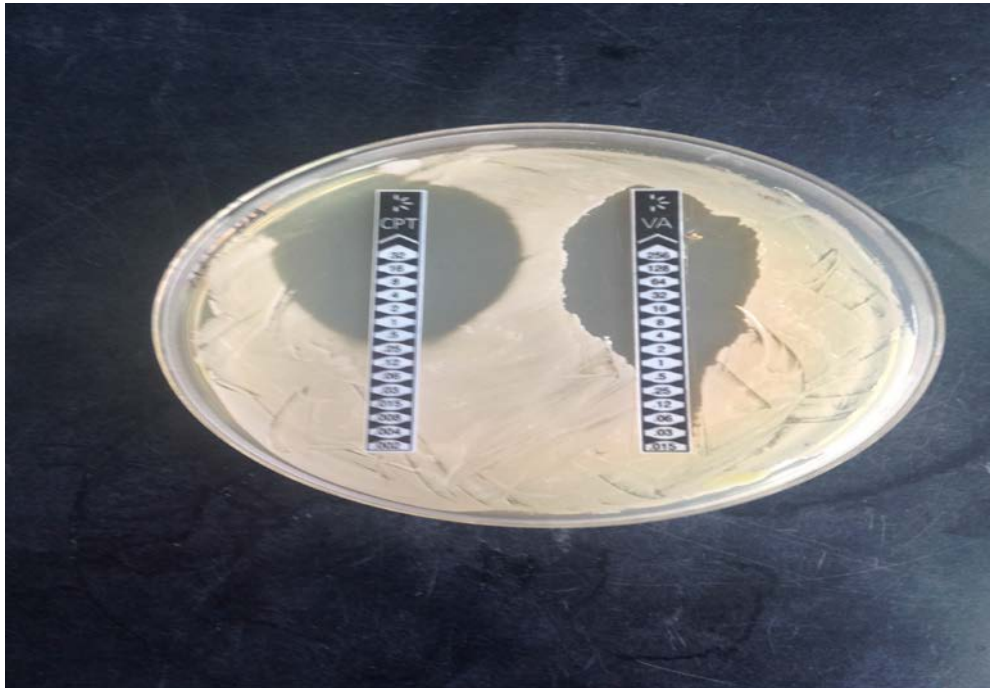
CEPA	ORIGEN	CIP	CN	CPT	DA	LZ	P	VAN	TE
15/4203		32*	0,06	0,5	>256*	0,5	0,5	1	2
15/4290		0,25	0,06	0,5	1	1	0,5	1	2
15/6769		0,25	0,12	0,25	>256*	1	0,5	1	1
16/3925		>32*	0,06	0,5	>256*	1	1	1	2
18/7149		0,25	0,06	0,5	32*	0,5	1	0,05	1*

Tabla. CMIs de los 5 *C. aurimucosum* frente a 8 antimicrobianos: CIP (Ciprofloxacino), CN (Clindamicina), CPT (Ceftaroline), DA (Daptomicina), LZ (Linezolid), P (Penicilina), VAN (Vancomicina) y TE (Tetraciclina).

En dos de las cepas bacterianas de *C. aurimucosum* (15/4203) y (16/3925) se hallaron valores de CMI superiores al punto de corte establecido por el CLSI para ciprofloxacino cuyo punto de corte de la CMI es **>4**, de forma que estas dos cepas con valores de CMI superiores a 32 mostraron resistencia a Ciprofloxacino¹⁶.

Las cepas 15/4203, 15/6769, 16/3925 y 18/7149 mostraron resistencia al antibiótico daptomicina. El punto de corte de resistencia para este antimicrobiano establecido en >16 y presentaron las diferentes cepas valores superiores a 256 y una superior a 32.

La imagen siguiente muestra uno de los antibiogramas realizados en la parte práctica del trabajo, introducción a la metodología de los ensayos de susceptibilidad de antibióticos en cepas bacterianas:



Conclusiones:

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud global que tiene que ser enfrentado desde todos los sectores ya sea, salud humana, agrícola o ganadero. Es una problemática que se inició desde el comienzo del uso de los antibióticos. Los grandes organismos internacionales ya están tomando medidas y estrategias para el problema de salud que supone la farmacorresistencia. Son muy diferentes y diversos los mecanismos por los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencias, se debe continuar con la investigación de la transferencia genética horizontal, integrones, plásmidos y mutaciones para poder conocer mejor los mecanismos de resistencia y establecer dianas terapéuticas. De esta forma se podrá combatir la problemática. Uno de los ejemplos son las quinolonas que son antibióticos muy utilizados en la actualidad pero que presentan cada vez más resistencia lo que podría limitar su efectividad. En el trabajo práctico se ha determinado la resistencia antibiótica que presentan las cepas de *C. aurimocum* reflejando la realidad del problema que se debe abordar desde la investigación y el uso razonado de los antibióticos que tan importantes han sido para la evolución de la sociedad.

Bibliografía

1. World Health Organization. (2019). *High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows*. Available at: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>
2. High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. World Health Organization. 2019. Available from: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>
3. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010;74(3):417-433.
4. Martinez J. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2014;11:33-39.
5. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). World Health Organization. 2019. Available from: <https://www.who.int/glass/en/>
6. Klein E, Van Boeckel T, Martinez E, Pant S, Gandra S, Levin S et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015.
7. How can economics tackle the issue of antimicrobial resistance?. Open Access Government. 2019. Available from: <https://www.openaccessgovernment.org/issue-of-antimicrobial-resistance/64575/>
8. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban N. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(5):320-330.
9. Arber W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life*. 2014;4(2):217-224.
10. Forsberg K, Reyes A, Wang B, Selleck E, Sommer M, Dantas G. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science*. 2012;337(6098):1107-1111.
11. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo J, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66(5):551-559.
12. Buckner M, Ciusa M, Piddock L. Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing. *FEMS Microbiology Reviews*. 2018;42(6):781-804.
13. (ROBICSEK ET AL, LANCET INFECT DIS 2006) L. Martínez-Martínez, M.E. Cano, J.M. Rodríguez-Martínez, J. Calvo, A. Pascual. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6 (2008), pp. 685-711
14. K. Drlica, M. Malik. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem*, 3 (2003), pp. 249-282
15. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge J, Bernard K. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10(1):125-159.
16. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, Navas J. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
17. Jorgensen JH, Hindler JF. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 2007 Jan 15;44(2):280-6. Epub 2006 Dec 7.

